

APPARATUS FOR TRANSFECTING GENE

Publication number: JP2004147517

Publication date: 2004-05-27

Inventor: NOMURA SAYURI; MINOWA TAKASHI

Applicant: HITACHI LTD

Classification:

- International: C12N15/09; C12M1/00; C12M1/42; C12N15/09;
C12M1/00; C12M1/42; (IPC1-7): C12M1/00; C12M1/42;
C12N15/09

- European:

Application number: JP20020313616 20021029

Priority number(s): JP20020313616 20021029

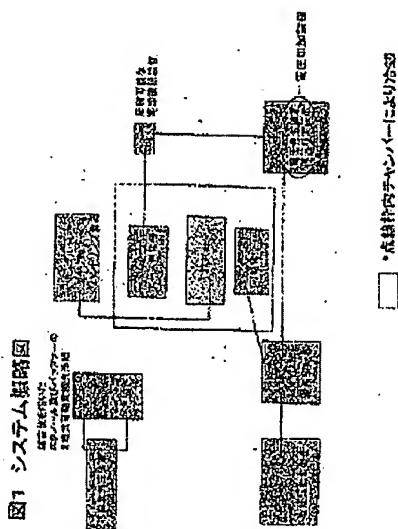
Report a data error here

Abstract of JP2004147517

PROBLEM TO BE SOLVED: To carry out a continuous treatment for efficiently transfecting a gene into cultured cells.

SOLUTION: The apparatus for transfecting the gene is composed by using an electrode controllable in the XYZ directions as an electroporation system, a plate supporting pedestal and a perforated plate with an electrode plate. Thereby, a plurality of specimens and a plurality of species of genes can simply and surely be treated to automate the transfection into the cultured cells at a high speed. Damage to the cells can be suppressed and an extraneous gene can be transfected into the cells with high efficiency by optimizing the shape and material of the electrodes, kind and period of electrical pulses and applying a voltage in a cooling chamber.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

JP 2004 147517 A 2004.5.27

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-147517

(P2004-147517A)

(43) 公開日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int.Cl.⁷

C12M 1/00

C12M 1/42

C12N 15/09

F I

C12M 1/00

C12M 1/42

C12N 15/00

A

A

A

テーマコード(参考)

4B024

4B029

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-313616(P2002-313616)

(22) 出願日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(特許庁注:以下のものは登録商標)

テフロン

Teflon

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(74) 代理人 100075096

弁理士 作田 康夫

(72) 発明者 野村 小百合

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

株式会社日立製作所ライフサイエンス推進

事業部内

(72) 発明者 箕輪 貴司

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

株式会社日立製作所ライフサイエンス推進

事業部内

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA04 GA14 HA19

4B029 AA24 BB01 CC01

(54) 【発明の名称】 遺伝子導入装置

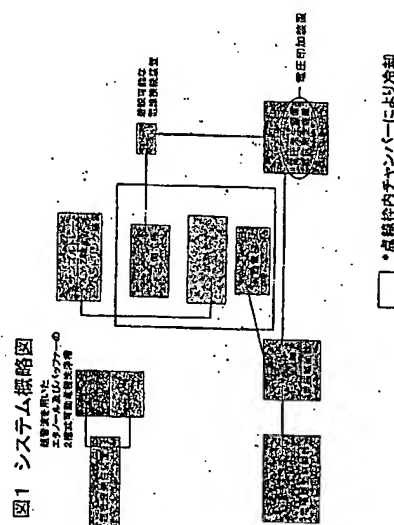
(57) 【要約】

【課題】本発明は、培養細胞に効率よく遺伝子導入するための連続処理が可能なエレクトロポレーション装置およびその関連装置に関する。

【解決手段】エレクトロポレーションシステムとしてXYZ方向に制御可能な電極とプレート支持台、電極板つき多孔プレートを用いることで、簡便かつ確実に多核体多種類遺伝子処理が可能となり、培養細胞トランスフェクションの高速自動化を実現する。

また、電極の形態や素材、電気パルスの種類や周期を最適化し、冷却チャンパー内で電圧印加を行うことにより細胞へのダメージを抑え、高効率で外来遺伝子を細胞に導入する。

【選択図】図1



(2)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

【特許請求の範囲】

【請求項1】

電氣的に遺伝子を細胞に導入するための遺伝子導入装置において、
細胞懸濁液を保持する複数のセルを備えたプレートと、
前記プレートを支持するための支持台と、
3次元移動制御部を備えた可動電極と、
前記プレートに接し、前記複数のセル内に電極の一部が挿入されたアース側電極と、
前記複数のセルと前記可動電極の位置を入力して前記支持台を移動させる制御部と、
前記電圧を発生するための電圧印可手段とを有し、
前記可動電極と前記アース電極は、前記細胞懸濁液を介して前記電圧印可手段による電圧 10
を通電することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項2】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、前記可動電極は、距離センサーを備え、前記可動電極と前記アース側電極との距離を測定することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項3】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、更に電圧印可前後のインピーダンスを測定し、遺伝子の導入された細胞の損傷程度を認識するためのインピーダンス測定手段を有することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項4】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、前記可動電極は、1本の電極、針状の電極、針 20
の先端を屈曲させた針状電極、針の先端に円盤状の電極を備えた電極のうちいずれか1つ以上の形態を有することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項5】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、前記アース側電極は、前記複数セル部分のみ格子状の板状電極、繊維状の導電性物質で形成した編目状電極、前記複数のセルの内壁に沿った形態の突起を板状電極に付加しため込み型電極、前記複数のセルに対応した棒状の電極を板状電極に組み込んだフラグ型電極のいずれか1つ以上の形態を有することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項6】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、前記プレート、前記可動電極、前記アース側電 30
極は、冷却チャンバー内にあり、一定の温度に保たれていることを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項7】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、さらに、前記可動電極を洗浄するための超音波発生装置を備えた洗浄装置を有することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項8】

請求項1記載の遺伝子導入装置において、前記電圧印可手段は、方形波パルスを発生することを特徴とする遺伝子導入装置。

【請求項9】

電氣的に遺伝子を細胞に導入する遺伝子導入方法において、 40
複数のセルを有するプレートの前記複数のセル内に培養細胞懸濁液を注入し、
前記培養細胞懸濁液中の細胞に導入する遺伝子を前記複数のセルに添加し、
前記複数のセルと3次元移動制御部を備えた可動電極の位置を入力し、
前記入力に基づいて前記プレートを支持する支持台を移動させ、
前記プレートに接し、前記複数のセル内に電極の一部が挿入されたアース側電極と、前記可動電極とにより、前記複数のセルのうち1つのセルに電圧をかけ、前記遺伝子を前記細胞に導入すること特徴とする遺伝子導入方法。

【請求項10】

請求項9に記載の遺伝子導入方法において、前記電圧をかける前後のインピーダンスを測定して細胞の損傷程度を認識することを特徴とする遺伝子導入方法。 50

(3)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

【請求項 11】

請求項 9 に記載の遺伝子導入方法において、前記電圧をかけた後、さらに前記可動電極を洗浄することを特徴とする遺伝子導入方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、培養細胞に外来物質を導入する手法に関し、より具体的には宿主細胞に核酸および低分子物質を直接導入する方法に関する。また、本発明は動物細胞に対し遺伝子を導入するエレクトロポレーション装置および関連装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞膜はハルス化電場により透過性にしうるということが古くから認識されている（例えばチンマーマン、U. バイオミカ・バイオフィジックス・アクタ、第 694 巻、第 227～277 頁（1982）；T. Y. ツォング、バイオフィジックス・ジャーナル、第 60 巻、第 297～306 頁（1991）；J. C. ウィーバー、ジャーナル・セル・バイオケミストリー、第 51 巻、第 426～435 頁（1993）参照）。この技術は電気的意のエレクトロポレーションと孔形成の意のポアー・フォーメーションに由来した用語でエレクトロポレーションあるいは電気穿孔法とも呼ばれている。すなわちエレクトロポレーション法は、短時間の高電圧負荷による電気刺激（電気ハルス）により一時的に細胞膜を破壊して穴をあけ、細胞外液中の分子（遺伝子や薬剤化合物）を細胞内に導入する方法であり、化学的処理で遺伝子導入効率が悪い細胞に対ししばしば用いられる。本法の利点は適用範囲が広く多種多様の細胞が処理できる点にある。さらに操作が簡単で処理時間が短いため、動物、植物、微生物の各分野に急速に普及しつつある。通常の発現用プラスミドベクターを導入し、目的遺伝子を一過性に発現させることができる。強制発現させるには発現ベクター、電極、電圧、電極間の距離など細かな条件検討が必要であるが、ひとたび条件が確立されると再現性がよく高発現を保証するため各分野で多用されている。

エレクトロポレーションにより細胞膜に適用された電界は、一時的な通過孔を細胞膜に形成する。ハルス発生機は電極間の間隙（cm）によって細胞に適用される電圧（kV）を提供する。この電位差はいわゆる電界強度を定義し、 $E = kV/cm$ の関係となる。各細胞は最良のエレクトロポレーションのための固有の臨界電界強度を有している。これは細胞サイズ、細胞膜組成、及び細胞壁自体の固有の特性によって定まる。一般的に言えば、必要な電界強度は細胞サイズに反比例して変化する。乳生物の細胞は典型的には $200 V/cm$ から数 kV/cm の電界強度を必要とする。発生される電界の特性は、細胞の種類や状態によって決定される。電界は均質で、適正な強度であることが望ましい。過剰な電界強度は細胞の溶解をもたらす、低電界では効果が低い。

電圧の印加は、通常、等張液となるように浸透圧を調整した DNA 溶液に細胞を懸濁し、電極の端が懸濁液に接触するように電極を設置して行われる。電極の形状、電圧、加電時間、および加電回数は、種々の要因、特に遺伝子導入効率や細胞の生存率などを考慮して適宜選択される。

ハルス発生機で提供される電気信号の波形は、指数的に減衰するハルス、方形ハルス、単極振動ハルスプレートン（unipolar oscillating pulse train）、あるいは双極振動ハルスプレートン（bipolar oscillating pulse train）が適用される。ハルス長は 10 マイクロ秒から 100 ミリ秒でよい。波形、電界強度、及びハルス持続時間は細胞種やバッファー条件、細胞に導入する外来分子のタイプによって異なる。

エレクトロポレーション法は乳類細胞に外来性の DNA を高い効率で導入する方法であり、一對の電極を有する容器に細胞の懸濁液と導入すべき DNA を入れ、懸濁液中に浮遊した細胞に高電圧ハルス電流を流して細胞膜に通過孔を生ぜしめ、この通過孔を通して外来性の DNA を細胞内に導入しようというものである。

このエレクトロポレーションの為に装置は、多くのものが市販されており、例えばバイオ

10

20

30

40

50

(4)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

ラッド (Bio Rad) 社製のジーンパルサー II (Gene Pulser II; 商品名)、島津製作所の GTE-1、ビーコン社製のビーコン 2000 および米国 Pds Inc. 製のサッパ等がこの方法において利用可能である。

エレクトロポレーションの方法は、例えば上記プラスミド DNA ($1-100 \mu\text{g}/\text{ml}$) と上記培養細胞 (10^7-10^8 細胞/ ml) を含む K-PBS バッファー等の液体媒体中に懸濁し、これに電気パルスを加えてプラスミド DNA (外来遺伝子) を細胞中に導入する。

電気パルス処理は、 $22-1000 \mu\text{F}$ のコンデンサーをもちいて $100-500 \text{V}/\text{cm}$ の初期電圧の直流パルスで印加するのが好適である。

【0003】

10

【発明が解決しようとする課題】

従来、パルス発生装置に接続した電極は固定され、実験者が単独キュベットを出し入れしてエレクトロポレーション処理を行っていた。このため、1回の操作で1種類の遺伝子導入体しか作成することが出来ず作業効率が悪いという問題があった。こうした従来の煩雑な処理が必要なエレクトロポレーション装置は研究室レベルでは必要に耐えうるが、簡便性や迅速性が求められる産業レベルでは実用的ではない。

また、従来の遺伝子導入装置は、高価であり、且つ数百ボルトの電流を使用するため取り扱い上、問題が起きぬように注意を払いながら使用していた。このため、上記装置を使用する場合には使用者に危険性に伴うフレクチャーを与えてしまうことから、上記装置に対する安全性及び信頼性の向上が図れないという問題があった。

20

本発明の目的は、上記問題を解消し、使用者に対する安全性及び信頼性を図り、細胞の完全性及び生物学的機能を保ちながら、一括して種々の遺伝子を導入することにより細胞の処理数を向上させ、手間を省き時間の短縮を可能とする安全なエレクトロポレーション装置を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明は上記課題を解決するために、多穴プレート上の細胞懸濁液保持セル内に任意の電極間距離を設定した可動電極を用いて自動制御にて遺伝子を導入する装置を提供するものである。

【0005】

30

すなわち本発明は、細胞懸濁液を保持する複数のセルを具備したプレートと、上記複数セル内の細胞に遺伝子を導入する電極と、上記プレートと上記電極および2種類の電極同士の相対位置を移動させる駆動部と、試料導入の際の上記プレート若しくは上記細胞懸濁液に対する上記電極の位置を入力させ上記移動を制御する制御部とを有し、遺伝子を上記条件で上記複数セル内の細胞に導入することを特徴とするエレクトロポレーション装置を提供する。

【0006】

さらに、同時多数検体処理の為、上記駆動装置よりなる支持台上にセットされたプレートは、容量及び形態について、例えば底面が平面の円筒のように2種の電極が一定距離を保ったまま内部に移動が可能であることを特徴とする穴を有する。

40

【0007】

本発明によれば、多数検体処理、遺伝子導入操作が簡便かつ確実になり、細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入実験を効率的に行うことができる。

【0008】

【発明の実施の形態】

培養細胞にエレクトロポレーションにより DNA 断片を導入する事が好ましいが、その方法は以下のように行うことが出来る。培養液を洗い落とした細胞をバッファーに 10^7-10^8 個/ ml 懸濁し、上述の方法で準備した DNA 断片を $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}-100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $0.1-50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 入れて 4°C でしばらく置した後、エレクトロポレーションを行う。パルスの波形としては、指数減衰波、方形波、交流波のいず

50

(5)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

れも用いることができるが、望ましくは方形波が良い。パルスは矩形波であれば、パルス幅 $1\text{ nsec} - 1000\text{ msec}$ 、電場強度 $1.0\text{ V/cm} - 1000\text{ kV/cm}$ を用いることが出来る。電気パルスが電界強度 $300 - 600\text{ V/cm}$ の場合、時定数 $10 - 50\text{ msec}$ と考えられる。電圧の設定は、電極を設置した際（例えば挿入された針）の測定抵抗値に依存する。使用される細胞の種類に適切なパラメータを決定する。上記のように電極間隔、パルス幅、パルス強度、パルス回数については、波形や細胞の種類によって適宜異なるが、通常、電極間隔 $0.1 - 3\text{ mm}$ 、好ましくは $0.5 - 2\text{ mm}$ 、パルス幅 $30 - 500\text{ }\mu\text{S}$ 、好ましくは $50 - 200\text{ }\mu\text{S}$ 、パルス強度 $1 - 30\text{ kV/cm}$ 、好ましくは $3 - 7\text{ kV/cm}$ 、パルス回数 $1 - 15$ 回、好ましくは $1 - 10$ 回の範囲で選ぶことが出来る。最適なエレクトロポレーション条件は細胞種やバッファー条件によりいくらか変化するが、本明細書の実施例に記載された一般的な方法を使用することができる。最適な条件は当業者により常用の実験で決定することができる。

図1は本発明によるシステムの概略を示した図である。可動電極、試料台、アース側電極は電圧印加による細胞のダメージを軽減する為に冷却チャンバー内で作動させる。可動電極は電極駆動制御器により電極駆動器を介してXYZ軸の3次元方向に作動可能となる。アース側電極はサンプリングトレーハンドリング装置によりXYZ軸の3次元方向に制御されるサンプルプレートと接着させて用いる為、サンプルプレートを介して3次元方向に作動可能となる。これにより可動電極とアース側電極の相対位置について微調整が可能となる。電圧発生装置および抵抗測定装置よりなる電圧印加装置は両電極に連絡し、エレクトロポレーションの電気状態を調整する。アース側電極は使い捨てて使用するため、電圧印加装置との連絡はプラグ側にロクリップのように着脱可能な接続装置を介して行う。可動電極は複数回使用を前提としている為、洗浄装置を必要とする。洗浄装置は例えば電極付着物を効率よく除去する為に超音波発生装置を備えたエタノールおよびバッファーの2槽式とする。

図2はエレクトロポレーションの作業工程を示した図である。培養プレートより回収後、バッファーで洗浄して好適な濃度に懸濁した培養細胞をセルに分注し、導入遺伝子（例えばプラスミドDNA）溶液添加後して数分室温にて置、その後対象細胞に好適な条件で電圧印加を行う。エレクトロポレーション処理された細胞は回収され、導入遺伝子発現検定時まで培養される。

図3は電極構造を模式的に示した図である。パルス発生装置およびインピーダンス測定手段よりなるパルス印加部はアース側電極及び可動電極と連絡して電圧印加条件を調整する。インピーダンス測定手段は、パルス印加前後において、遺伝子導入用電極装置のインピーダンスを測り、導入対象の細胞の損傷程度を知るためのものである。このインピーダンスを測定し、インピーダンスを適切にすると、パルス印加手段の印加条件を最適化（細胞の損傷が過大にならず、かつ、遺伝子導入の効率を高くすること）ができる。可動電極は電極支持台に固定されたフリーアーム型XYZ移動制御部を介して3次元方向に移動可能である。アース側電極は非導電体よりなるサンプルプレートに接着して設置される。これにより2種の電極が短絡せずに効率的な電圧印加が行える距離条件で稼動可能となる。

図4は電極構造の一例を詳細に示した図である。可動電極は電極制御部、電極駆動部、電極保護容器、距離センサーにより位置を制御され、電極端をセル内に侵入させる。アース側電極はサンプルプレートに接着し、セル内に電極の一部を挿入した形態をとる。セル内に挿入されたアース側電極の一部分は細胞懸濁液と常に接触している。これに対し、可動電極は遺伝子添加後にセルに侵入して細胞懸濁液に接触する。アース側電極と可動電極は、高電圧印加時に細胞懸濁液（塩溶液）を介して通電することにより培養細胞に対して遺伝子導入が可能となる強い磁界を形成する。また、距離センサーにより電極間の距離を測定し、電極同士の接触による短絡を防止する。

図5は本発明で用いる可動電極の形態の例である。本発明の方法において、電気的な衝撃を与えるのに使用される電極は任意の適する形状もしくは配置を有することができる。

(1) 標準的な1本電極である。(2) 生体組織にエレクトロポレーションを行う際に用いられる針状電極である。(3) 電界を広げるため先端を屈曲させた針状電極である。(

10

20

30

40

50

(6)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

4) (5) 電界を広げる為に考えられた、(3)とは別の形態の例である。(4)は板状電極をセルの口形にあわせて円盤状としたものである。(5)は(4)と同様、円盤状電極を繊維状の導電性物質で形成したものである。尚、導入時間短縮のために、可動電極は複数個にすることもできる。

可動電極として中空電極を使用する場合、遺伝子導入溶液をこの中空を介して細胞に投与することができる。さらに、可動電極はDNA添加、DNA添加後の細胞懸濁液の装置としても機能する。

図8は本発明で用いうるアース側電極の形態の例である。可動電極と同様、電気的な衝撃を与えるのに使用される電極は任意の適する形状もしくは配置を有することができる。

(1)板状電極:電圧印加後、培養細胞懸濁液をセル内に維持するためセル部分のみ格子状の隙間を作っている(2)網目状電極:細胞懸濁液の流動性を重視し、隙間をふやすために繊維状の導電性物質で形成した(3)め込み型電極:セル内壁に密着する形で筒型の突起を板状電極に付加した(4)プラグ型電極:可動電極と同様に棒状を基本とする形態の電極を板状電極に組み込んだ。この板状電極を非伝導体であるフレート上にセットすれば、突出した電極部分が細胞懸濁液に接触する構造となる。(5)使い捨て電極:形状は(4)と同様であるが、この電極は使い捨てを前提としているため、セル内挿入部分のみ取り外せるよう、セル開口縁にアタッチメントを具備する。

電極の挿入操作を自動化する場合にその制御方法としては、可動電極とアース側電極との電位の変化を検出する手段が考えられる。

電極を構成する導電性材料は、カーボン、白金、金、チタン、銀、塩化銀、銅、ステンレス、タングステン、鉛または塩化銅等の中から適宜選択される。あるいはアルミニウム、金、白金は蒸着処理により非伝導体に導電層としてメッキできる材料から適宜選択される。白金黒は金属白金が微細な海绵状になったものであり、表面積が大きい為電極のインピーダンスを下げる事が出来る特徴をもち、生体適合性にも優れるため網目状電極に好適である。

フレートの穴に試料導入前の細胞懸濁液を満ちし、直行移動台と水平移動台の上に設置しこの直行移動台と水平移動台の移動を制御装置によりX軸方向及びY軸方向に制御することによって位置決めを行う。フレート支持台にはフレート設置基準を設ける。これはくぼみやストッパーといった物理的位置マーカー、ペイントによる位置指定、自動位置決め装置の利用など、位置指定方法は上記の例に限定されない。これに対しさらに可動式電極を動かしてセルおよび各電極3者の相対位置を適正に決定し、試料を導入する。

エレクトロポレーション工程後、アース側電極はフレートから外す。遺伝子導入した培養細胞回収後、サンプルフレートは1回の使用後廃棄する。そのようなサンプルフレートは使い捨て式のものであり、例えば市販のフレートをそのまま用いることができる。成形材料としては使い捨て式であることと、電極接続を考慮すれば、ポリプロピレンやポリエチレンなど、非伝導性で耐薬品性をもち、成形性もよい汎用エンジニアリングプラスチックが適する。

可動電極は繰り返し使用し、再使用にあたり洗浄する。特に、培養細胞懸濁液試料と接触する先端部分は十分な洗浄が必要である。アース側電極は材料及び使用方法によって使用回数を決定する。

冷却したチャンパーは、エレクトロポレーション工程の間、細胞を一定温度に保つのに好ましく、それによって、細胞の生存率が向上する。これは、エレクトロポレーション工程の間、電気パルスによって生成された過剰な熱を除去することによって達成される。過剰な熱は、電極を冷却するか、またはチャンパーを用いて電極及びサンプルの磁界発生部全体を冷却することによって除去することができる。チャンパーは、セラミック、テフロン(Teflon)、アレキシグラス(Plexiglas)、ガラス、プラスチック、シリコン、ゴムまたは他の合成材料を含むがこれらに制限されない、あらゆるタイプの絶縁材料で作成することができる。好ましくは、チャンパーはガラスまたはポリスルホンからなる。

導入する試料は、遺伝子、低分子等エレクトロポレーションで導入可能なものとする。ま

10

20

30

40

50

(7)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

た、下記の実施例では改変コドンをもつ緑色蛍光蛋白質（GFP）を導入したHeLa細胞について記載するが、遺伝子導入は発現ベクター利用に限定するものではなく、人工的にプロモーター部位をつなげてPCR増幅した直鎖DNA及び合成RNA、生体試料由来のtRNAであっても良い。

以下の例により本発明の実施形態例をより具体的に説明する。

HeLa細胞は37℃5分でトリプシン-EDTA処理により培養シャーレ底面より剥離させた後、1500rpm5分で遠心回収した。この際、細胞はK-PBSを用いて、 1×10^7 個/mlとなるよう懸濁した。12ウェルの細胞培養用プレートに上記HeLa細胞懸濁液を2mlずつ分注した。この懸濁液に、プロモーターとしてCMV、外来遺伝子としてGFP遺伝子およびターミネーターとしてSV40を有するプラスミドDNA PQBI25 (TAKARA)を10μg添加し、4℃で5分間冷却した。その後電極が設置されているクロマトチャンバーに移し、アース側電極を ぬ込んだ。

アース側電極はアルミ板を ぬ込み型に成型して用いた。エレクトロポレーション電源装置 (Gene Pulser II) に既存の2本型電極を接続し、片方をセル内壁に接着したアルミ部分に接触させ、もう片方を細胞懸濁液中に侵入させて、直流の電気パルスを加した。その際、1ウェル当たり800μFのコンデンサーを用いて250V/cmの初期電圧をかけた。遺伝子導入のための時間は、設定した電圧や電気抵抗に応じて電気パルス発生の為に必要な時間と、電極位置をセル内で決定するのに必要な時間で規定され、オートメーション化設定することにより短縮できる。パルス印加後、遺伝子導入された細胞を新しい培養用プレートに移した。4℃で5分間冷却後、DMEM培地FBS(-)9mlを加えて室温で5分間 置し、FBSを1/10容量加えた後、37℃でインキュベートを開始し、発現検定を行った。

24時間培養後、すべてのウェルでGFPを発現した細胞が観察された。

【0009】

【発明の効果】

本発明によれば、連続的に使用可能な電極を用いてマイクロプレート内の細胞に導入すること、エレクトロポレーションの作業工程を効率化する。更に、条件を最適化し、多検体への多種類遺伝子導入が可能となることにより簡便で迅速な遺伝子導入処理を可能とする遺伝子導入装置を提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本特許のエレクトロポレーションシステムの概略図である。

【図2】本特許のエレクトロポレーションにおける一連の作業工程を示す図である。

【図3】本特許における2分極化電極の連絡形態を示した電極構造図である。

【図4】本特許における2分極化電極の使用形態を詳細に示した電極構造詳解図である。

【図5】本特許における可動電極の取りうる形態を例示した図である。

【図6】本特許におけるアース側電極の取りうる形態を例示した図である。

10

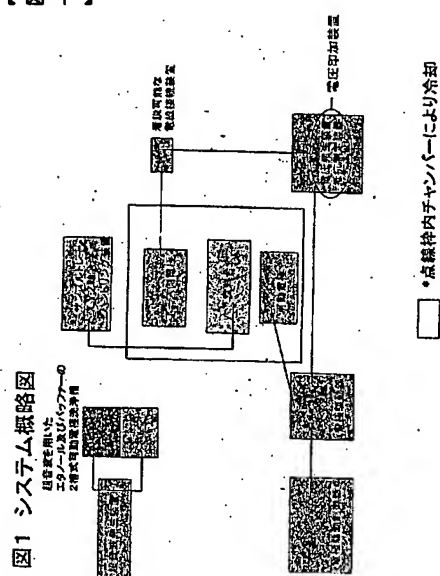
20

30

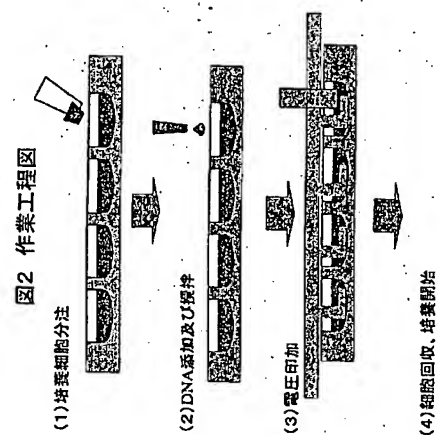
(8)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

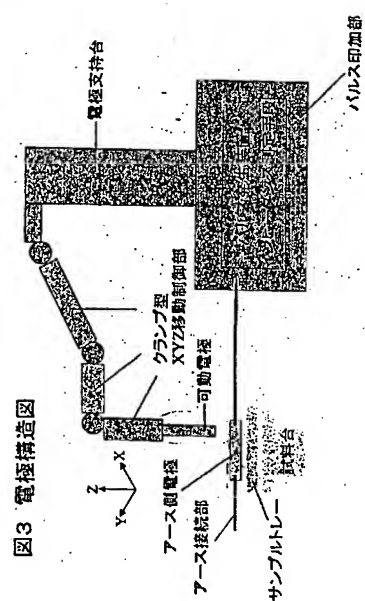
【図1】



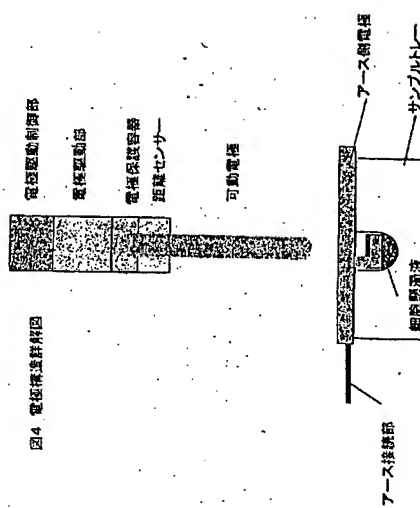
【図2】



【図3】



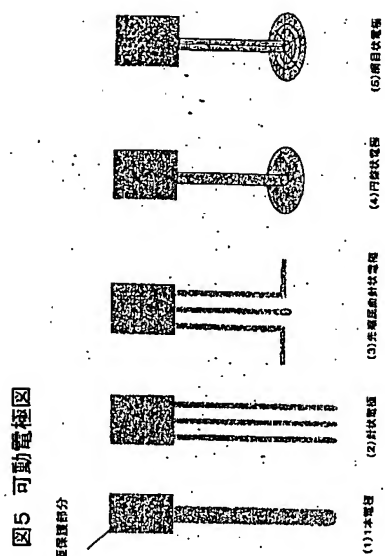
【図4】



(9)

JP 2004 147517 A 2004.5.27

【図 5】



【図 6】

